

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/75290 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 5/06,
5/08

HATZFELD, Jacques, Alexandre [FR/FR]; 44, rue
Florian, F-92160 Antony (FR). HATZFELD, Antoinette
[FR/FR]; 44, rue Florian, F-92160 Antony (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01486

(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal
etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de
Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 30 mai 2000 (30.05.2000)

(81) États désignés (*national*): CA, JP, US.

(25) Langue de dépôt: français

(84) États désignés (*regional*): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(26) Langue de publication: français

Publiée:

(30) Données relatives à la priorité:
99/07011 3 juin 1999 (03.06.1999) FR

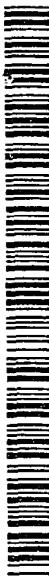
— Avec rapport de recherche internationale.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris
Cedex 16 (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*):



A1

WO 00/75290

(54) Title: METHOD FOR MULTIPLYING STEM CELLS

(54) Titre: PROCÉDÉ DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES

(57) Abstract: The invention relates to the use of a cellular development inhibitor in a controlled manner in order to maintain an undifferentiated stem cell state, especially one of human stem cells, whereby cell division is permitted.

(57) Abrégé: L'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée pour maintenir l'état indifférencié de cellules souches, notamment de cellules souches humaines, tout en permettant leur division cellulaire.

PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES

La présente invention a pour objet un procédé de multiplication de cellules souches. L'invention a notamment pour objet un procédé permettant à la fois de multiplier rapidement lesdites cellules souches et de les maintenir dans un état indifférencié.

Les cultures actuelles qui permettent le maintien des cellules souches dans un état indifférencié, et notamment des cellules souches hématopoïétiques, et/ou les multipliant, sont des cultures à long terme dans lesquelles les cellules se divisent très lentement. Plus particulièrement, les cultures permettant par exemple un autorenouvellement (une multiplication à l'identique) de cellules souches, notamment de cellules souches hématopoïétiques, sont uniquement des cultures sur stroma médullaire, ou des cultures à multiplication lente, en l'absence de stroma médullaire.

S'agissant plus particulièrement des cultures à long terme sur stroma médullaire, on peut citer les cultures de type Dexter, dans lesquelles les cellules souches, notamment les cellules souches hématopoïétiques, se développent sur un stroma médullaire, ce qui permet de n'utiliser que peu de cytokines mais entraîne une division lente des cellules (et donc une multiplication lente des cellules) en présence d'un mélange de progéniteurs avec des cellules matures hématopoïétiques et stromales.

De plus, contrairement à ce qui se passe chez la souris, il n'y a pas de maintien à long terme chez l'homme de cellules souches sur stroma.

S'agissant des cultures à long terme, en l'absence de stroma médullaire, on peut mentionner le système de culture de Piacibello. Dans ce système de culture (Piacibello et al. 1997 Blood), les cellules CD34⁺ contenant des cellules souches hématopoïétiques sont ensemencées à 20000 cellules par ml, et chaque semaine la moitié de la culture est prélevée et remplacée par du milieu frais. Après deux semaines, le nombre de cellules double à un rythme de une fois par semaine, sur plusieurs mois. Pendant les deux premières semaines de la culture de Piacibello, il y a une forte perte des cellules CD34⁺ qui se stabilisent à moins de 2%.

Ainsi, les cultures actuelles sont peu compatibles avec une production à des fins cliniques ou biotechnologiques de cellules souches maintenant leur caractère indifférencié et multipotent.

Par ailleurs, à ce jour on ne connaît pas d'inhibiteur de la différenciation de cellules souches permettant un autorenouvellement continu satisfaisant.

L'un des principaux buts de l'invention est de proposer un procédé de culture de cellules souches permettant d'obtenir, rapidement et en quantité importante, des cellules souches humaines dans un état indifférencié.

5 L'un des buts de l'invention est de proposer un procédé rapide de culture de cellules souches, sans stroma médullaire, et permettant de réduire les volumes de culture.

L'un des autres buts de l'invention est d'utiliser les cellules souches ainsi obtenues pour reconstituer des tissus et des organes à transplanter.

10 L'invention a pour objet l'utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée pour maintenir l'état indifférencié de cellules souches, notamment de cellules souches humaines, tout en permettant leur division cellulaire.

15 La présente invention découle de la découverte faite par les Inventeurs que, dans certaines conditions, un inhibiteur du développement cellulaire peut être également un inhibiteur de la différenciation cellulaire de cellules souches. A ce titre, le TGF- β (« transforming growth factor » (facteur de croissance transformant)), préalablement connu comme un inhibiteur du développement cellulaire de cellules souches, et notamment de cellules souches hématopoïétiques ou progéniteurs primitifs hématopoïétiques se révèle être, selon l'invention, un inhibiteur de la différenciation cellulaire.

20 L'expression « inhibiteur du développement cellulaire » englobe à la fois toute substance inhibant la prolifération cellulaire et/ou la croissance cellulaire, et/ou la différenciation cellulaire.

L'expression « inhibiteur de la prolifération cellulaire » signifie également inhibiteur de la division cellulaire, ou inhibiteur du cycle cellulaire.

25 L'expression « utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée » signifie que l'inhibiteur du développement cellulaire est utilisé de façon modulable afin de permettre :

30 (a) la division cellulaire des cellules souches lorsque celle-ci est souhaitée, tout en maintenant l'état indifférencié desdites cellules souches au cours ou à la fin de la division cellulaire, ou,

(b) l'inhibition du développement cellulaire des cellules souches lorsque celui-ci est nécessaire pour inhiber la différenciation cellulaire desdites cellules souches.

L'expression « utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée » signifie, en d'autres termes, que l'inhibiteur du développement cellulaire

peut être utilisé dans des conditions telles que les cellules souches sont sorties de leur état de repos afin de se diviser, dans des conditions contrôlées empêchant la différenciation.

5 L'expression « cellules souches » signifie cellules immatures, ou bien cellules non différenciées (ou indifférenciées), ou bien cellules primitives, ou bien cellules pluripotentes ou cellules multipotentes.

10 Les cellules souches avantageusement utilisées selon l'invention sont des cellules souches humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et/ou les cellules souches/progéniteurs somatiques elles/eux mêmes à l'origine du sang et/ou de différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

15 L'expression « cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques » est définie par exemple comme une cellule pouvant donner naissance à l'une quelconque des cellules souches somatiques.

L'expression « cellules souches somatiques » est définie par exemple comme une cellule pouvant donner naissance à un tissu spécifique.

20 Les cellules souches selon l'invention sont notamment les cellules souches somatiques humaines hématopoïétiques, encore appelées progéniteurs primitifs hématopoïétiques.

25 Selon un mode de réalisation avantageux, l'inhibiteur du développement cellulaire utilisé avantageusement selon l'invention est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF- β). Par le terme "cytokines", on désigne tous les facteurs de croissance, même si ces facteurs peuvent agir également comme des inhibiteurs de la croissance dans certaines conditions.

30 Comme produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, on peut notamment citer les facteurs de croissance, les cytokines, le produit de gènes contrôlant la différenciation, le vieillissement ou l'apoptose.

Comme inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes on peut notamment citer le gène du rétinoblastome, les gènes P15, P16, P21, P27.

Le gène du rétinoblastome est un gène suppresseur de tumeur (anti-oncogène).

Les gènes P15, P16, P21, P27 inhibent le cycle cellulaire.

Comme facteur contrôlant l'apoptose, on peut notamment citer les gènes bcl-2, bax, fas.

5 Comme facteur contrôlant le vieillissement, on peut notamment citer la télomérase.

Comme cytokines pouvant être des inhibiteurs du développement cellulaire, on peut notamment citer les interférons et en particulier le TGF-β.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet l'utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire tel que défini ci-dessus, en association séquentielle avec un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, pour déclencher un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment pour déclencher une seule division cellulaire, tout en maintenant l'état indifférencié des cellules souches, notamment des cellules souches humaines.

15 L'expression « association séquentielle » signifie que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire n'est pas utilisé de façon simultanée avec l'inhibiteur du développement cellulaire.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet un procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de repos sont sorties de leur état de repos par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire, produit par les cellules et/ou présent dans le milieu de culture, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire,

30 - et, une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, obtenues à l'étape précédente sont inhibées dans leur différenciation, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire.

L'invention a également pour objet un procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape selon laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de division sont empêchées d'entrer dans un état de différenciation, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire,

5 - et, une étape selon laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, obtenues à l'étape précédente sont remises dans leur état de division, par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

10 Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que, au cours et à l'issue dudit procédé, les cellules souches ainsi multipliées sont maintenues dans un état indifférencié.

15 Selon l'invention, l'expression « cellules souches multipliées » a la même signification que l'expression « cellules souches amplifiées ». De même l'expression « procédé de multiplication » a la même signification que l'expression « procédé d'amplification ».

L'état de repos des cellules signifie que les cellules ne se différencient pas et ne se divisent pas.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, les cellules souches multipliées selon le procédé de multiplication de l'invention, sont des cellules souches humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et les cellules somatiques elles-mêmes à l'origine du sang et/ou des différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

25 Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que les cellules souches, notamment les cellules humaines, sont présentes à une concentration cellulaire d'environ 1 à environ 10^{10} cellules par ml, et notamment à une concentration allant d'environ 10^3 à environ 10^{10} cellules par ml, et plus particulièrement d'environ 10^4 à environ 10^9 cellules par ml.

30 Il faut noter que la présente invention s'applique aussi bien aux cellules humaines qu'aux cellules animales.

Dans le procédé de multiplication de l'invention, l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, notamment les cellules souches

humaines, et/ou est ajouté dans le milieu de culture contenant les cellules souches, notamment les cellules souches humaines.

Ledit inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches et/ou est ajouté dans le milieu de culture :

5 (a) avant la première division cellulaire, et
(b) au cours ou à la fin d'un cycle de division (lorsque lesdites cellules se trouvent préalablement en état de division).

Lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, il peut être sécrété ou non.

10 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire synthétisée par les cellules souches, ou ajoutée dans le milieu de culture, doit être suffisante de façon à ce que lesdites cellules (a) soient maintenues dans leur état de repos avant la première division cellulaire, et (b) soient placées à l'état de repos lorsqu'elles se trouvaient préalablement en état de division.

15 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire synthétisée par les cellules souches peut varier de 0,01 pg à 1 mg/ml dans le milieu de culture, et notamment de 0,1 pg à 10 ng/ml.

20 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire ajoutée dans le milieu de culture peut varier de 0,1 pg à 1 mg/ml dans le milieu de culture, et notamment de 1 pg à 10 ng/ml.

25 Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β).

30 Les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, ainsi que les cytokines sont notamment ceux décrits ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'inhibiteur du développement cellulaire est présent à une faible concentration dans le milieu de culture contenant les cellules souches, et notamment à une concentration allant d'environ 10^{-10} mg/ml à 1 mg/ml.

Le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, est effectuée par :

5 - l'addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, et/ou

- le retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire.

10 La neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire permet aux cellules souches de sortir de leur état de repos et de déclencher au moins une division.

De préférence, lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé sans être sécrété par les cellules souches, l'effet dudit inhibiteur est neutralisé par addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, qui peut pénétrer dans la cellule, tel qu'un oligonucléotide antisens.

15 Cependant, lorsque l'inhibiteur du développement cellulaire est sécrété par les cellules souches, ou lorsque ledit inhibiteur est ajouté dans le milieu de culture, l'effet dudit inhibiteur est neutralisé soit par addition dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, soit par retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire.

20 Le retrait de l'inhibiteur du développement cellulaire du milieu de culture peut notamment être effectué à l'aide d'anticorps bloquants ou par lavage afin de neutraliser ledit inhibiteur.

25 La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture contenant les cellules souches doit être suffisante de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

La quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture varie de 0,01 pg à 1 ng/ml, et notamment de 0,1 pg à 10 ng/ml.

30 L'inhibiteur du développement cellulaire retiré du milieu de culture appartient notamment au groupe des cytokines, des oligonucléotides antisens bloquant l'expression de gènes du développement.

La quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture contenant les cellules souches doit être suffisante de telle sorte qu'il y ait

déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire.

La quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture varie de 0,1 µg à 10 mg/ml pour les anticorps bloquants ou de 0,01 µM à 1 mM d'oligonucléotide antisens dans le milieu de culture, et notamment de 1 µg à 100 µg/ml pour les anticorps bloquants ou de 0,1 µM à 100 µM d'oligonucléotides antisens.

L'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est choisi dans le groupe constitué par des oligonucléotides antisens ou des anticorps bloquants et notamment par l'anti-TGF-β.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est présent en une concentration allant d'environ 10^{-18} à environ 10^{-3} g/ml, notamment 0,1 à 20 µg/ml, et notamment $4 \cdot 10^{-6}$ g/ml (4 µg/ml).

Le procédé de multiplication selon l'invention des cellules souches, notamment des cellules souches humaines, est caractérisé en ce qu'il comporte, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules souches maintenues à l'état indifférencié, un nombre total de cycles de divisions (ou d'états de division) compris entre 1 à 100 cycles, notamment entre 5 à 20 cycles, et notamment 10 cycles.

Selon un mode de réalisation avantageux, la durée totale de l'ensemble des états de repos du procédé de multiplication selon l'invention varie de 1 heure à 3 ans, notamment de 20 heures à 200 heures, et la durée totale de l'ensemble des cycles de division du procédé de multiplication selon l'invention varie de 10 heures à 3 ans et notamment de 20 heures à 200 heures.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication selon l'invention est caractérisé en ce que la durée d'un seul état de repos s'échelonne d'environ 1 heure à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 72 heures, et en ce que la durée d'un seul cycle de division s'échelonne d'environ 6 heures à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 24 heures.

La durée totale du procédé de multiplication selon l'invention comprenant l'ensemble des états de repos et de division s'échelonne de 1 jour à 3 ans, et est notamment de 1 jour à 15 jours.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'ensemble des cycles de repos et de division d'un procédé de multiplication dure de 1 à 15 jours, et les applications envisagées sont la thérapie cellulaire.

5 Selon un autre mode de réalisation, l'ensemble des cycles de repos et de division d'un procédé de multiplication dure de 1 jour à 3 ans, et les applications envisagées sont d'ordre expérimental.

Un procédé qui dure 3 ans permet par exemple des expériences de longue durée pour étudier la sénescence.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de multiplication des cellules souches selon l'invention, et notamment des cellules souches somatiques humaines, permet d'obtenir une amplification des cellules souches d'un facteur compris d'environ 2 à environ 10^{12} , et notamment d'environ 2 à environ 10^4 .

15 Ainsi, le procédé de multiplication selon l'invention permet d'obtenir un nombre de cellules souches amplifiées et maintenues à l'état indifférencié, de 2 à 10^{12} fois plus important que le nombre initial de cellules souches non différenciées.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, le milieu de culture du procédé de multiplication selon l'invention, contient des cellules souches hématopoïétiques et comprend une ou plusieurs cytokines (ajoutées dans le milieu de culture) choisies dans le groupe constitué par les interleukines et les CSF, lesdites cytokines étant présentes à une concentration allant d'environ 10^{-8} µg/ml à environ 1 mg/ml, et notamment d'environ 10^{-5} µg/ml à 0,1 µg/ml, et éventuellement d'autres facteurs de croissance.

25 Comme cytokines pouvant être ajoutées dans le milieu de culture, on citera notamment les interleukines telles que l'IL 1 à l'IL 16, les CSF (« colony-stimulating factor » (facteurs stimulant les colonies)) tels que le GM-CSF (facteur stimulant les colonies granulocytaires et monocytaires), GCSF (facteur stimulant les colonies granulocytaires), MCSF (facteur stimulant les colonies monocytaires), SF (Steel factor), la TPO (thrombopoïétine) ou le FL (Flt-3 ligand).

30 Des facteurs de croissance autres que les interleukines et les CSF peuvent être utilisés.

Le procédé de multiplication selon l'invention des cellules souches, et notamment des cellules souches somatiques humaines, est plus particulièrement caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

35 a) l'initiation d'un premier cycle de division de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées dans un milieu de culture, et notamment de cellules

souches somatiques hématopoïétiques, par ensemencement desdites cellules souches non différenciées à l'état de repos, à une forte concentration cellulaire initiale, notamment à une concentration allant de 10^3 à 10^{10} cellules par ml, en présence d'une ou de plusieurs cytokines, et par la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, de telle sorte que les susdites cellules sortent de leur état de repos par le déclenchement d'une première division cellulaire,

5 b) le retour au repos des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire, ledit inhibiteur étant synthétisé par lesdites cellules souches, ou étant ajouté dans le milieu de culture,

10 c) le lavage éventuel des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, afin d'éliminer les catabolites et l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment l'inhibiteur de la prolifération cellulaire éventuellement présents dans le milieu de culture,

15 d) la dilution éventuelle des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente afin de maintenir une concentration cellulaire optimale allant d'environ 100 à 10^{10} cellules par ml,

20 e) la répétition successive des cycles de division et de repos décrits ci-dessus jusqu'à ce que le facteur d'amplification des cellules soit suffisant pour obtenir le nombre de cellules souches souhaitées, et notamment soit de 2 fois à environ 10^{12} fois le nombre de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées initiales, ce qui correspond à une durée totale du procédé de multiplication d'environ 1 jour à 3 ans, et notamment de 1 jour à 15 jours,

25 f) l'arrêt de la multiplication des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées pour les stocker, les utiliser ou les faire se différencier *in vitro*.

Les modalités des différentes étapes du procédé de multiplication des cellules souches selon l'invention sont celles déjà décrites ci-dessus.

30 Ainsi, la quantité d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire ajoutée dans le milieu de culture, ou la quantité d'inhibiteur du développement cellulaire retirée du milieu de culture contenant les cellules souches, doit être suffisante afin qu'il y ait déclenchement d'une première division cellulaire.

Selon un mode de réalisation préféré, l'inhibiteur du développement cellulaire est le TGF- β ; le TGF- β est synthétisé par les cellules souches somatiques hématopoiétiques elles-mêmes en une quantité allant de 0,01 pg à 1 ng/ml.

Le TGF- β est ensuite neutralisé par l'ajout dans le milieu de culture d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire : l'anti-TGF- β . L'anti-TGF- β est ajouté en une quantité allant de 0,1 μ g à 100 μ g/ml d'anticorps ou 0,1 μ M à 10 μ M d'oligonucléotides.

Le retour au repos des cellules souches somatiques hématopoiétiques, notamment décrit dans l'étape b) ci-dessus, est obtenu par le TGF- β synthétisé par lesdites cellules souches elles-mêmes (ou d'autres inhibiteurs ajoutés).

L'étape de lavage © décrite ci-dessus permet notamment de neutraliser l'inhibiteur TGF- β formé au cours ou à la fin d'un cycle de division précédent afin de permettre la division suivante.

L'étape de dilution (d) décrite ci-dessus, maintenant une concentration cellulaire optimale permet à la fois :

- le retour rapide à l'état de repos des cellules souches, dû à une synthèse rapide desdites cellules de l'inhibiteur du développement cellulaire, notamment du TGF- β ,
- une division non moins rapide des cellules souches après chaque état de repos, en présence d'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, notamment d'anti-TGF- β .

Le TGF- β ralentit le processus de différenciation des cellules souches tout au long du procédé de multiplication, à savoir au cours et à la fin des différents cycles de repos et de division.

L'étape d'arrêt f) décrite ci-dessus peut être effectuée en lavant lesdites cellules souches ainsi multipliées, en les congelant, ou en les mettant dans un milieu de différenciation.

Le milieu de différenciation dans lequel sont mises les cellules souches ainsi multipliées et maintenues dans un état indifférencié selon le procédé de la présente invention, est choisi en fonction du tissu ou de l'organe que l'on cherche à reconstituer.

Par exemple, si l'on veut obtenir des cellules érythroïdes, on utilisera un milieu de culture contenant de l'érythropoïétine (EPO).

Le procédé de multiplication selon l'invention permet d'obtenir des productions importantes de cellules souches, lesdites cellules souches étant maintenues dans un état indifférencié au cours des différents cycles de repos et de division dudit procédé. On obtient ainsi des productions importantes de cellules immatures sous un volume réduit.

La présente invention a pour objet l'utilisation des cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention décrit ci-dessus, pour reconstituer du sang humain et/ou des tissus solides ou organes humains.

Ainsi, les cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention, peuvent notamment être utilisées pour amplifier des prélèvements insuffisants de sang de cordon ombilical, de moëlle osseuse ou de sang périphérique, ou pour la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention, peuvent également servir pour des études sur le génome humain (expression et fonction des gènes du développement humain).

Légende des figures

Les figures 1A et 1B représentent l'effet du TGF- β sur le maintien de l'état indifférencié des cellules CD34⁺.

Le colorant PKH26 qui se fixe à la membrane des cellules permet de déterminer le nombre de divisions que la cellule a effectué : après un doublement de la cellule, l'intensité du colorant est divisée par 2, après 2 doublements par 4 etc... On obtient ainsi différentes populations se déplaçant vers la droite..

En conditions de culture sans TGF- β (20 000 cellules par ml) (Fig. 1A), les cellules se divisent et après 3 jours, les cellules qui se sont divisées plus d'une fois ne contiennent que 1.1% de cellules CD34^{+fort}.

En conditions de culture selon l'invention, la concentration de TGF- β étant plus élevée (30 pg/ml de TGF- β) (Fig. 1B), on observe un pourcentage plus élevé de cellules CD34^{+fort}.

25

30

EXEMPLE : PROCEDE DE MULTIPLICATION DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

Matériels et méthodes

WO 00/75290

Les cellules souches utilisées dans l'exemple ci-dessous sont plus particulièrement des cellules souches somatiques humaines hématopoïétiques provenant de sang de cordon ombilical et caractérisées par le marqueur de membrane CD34+. Dans ce qui suit, lesdites cellules seront dénommées « cellules CD34+ ».

5 1) Marquage des cellules CD34+

Les cellules CD34+ sont diluées dans PBS (phosphate buffer saline) / BSA (bovine serum albumine) (0,2%) et incubées avec des anticorps anti-CD34+ conjugués à du FITC (fluoroisothiocyanate)(clone 8G12; Becton Dickinson, San José, CA) pendant 10 30 minutes à 4°C puis lavées 2 fois en PBS/BSA. Le contrôle est constitué par des cellules incubées avec des IgG1 non spécifiques conjuguées au FITC.

Pour détecter le colorant permettant de suivre la prolifération des cellules, les CD34+ sont marquées avec le colorant PKH26 (Sigma, France) selon les instructions du fabricant.

15 Les cellules avec une intensité moyenne de PKH26 sont triées dans une fenêtre représentant environ 10% de la largeur complète. Ceci correspond environ à 20% des cellules CD34+. Quatre aliquots de 400 cellules sont utilisées en test HPP-Q. Le reste des cellules au repos et des cellules qui prolifèrent sont triées et cultivées en milieu semi-solide. Des billes calibrées (Coulter-Beckman) sont utilisées pour standardiser les analyses entre le jour 0 et le jour 3.

20 20 Description du test HPP-Q (High Proliferative Potential-Quiescent Cell)

Le test HPP-Q permet de vérifier que l'inhibiteur du développement cellulaire, notamment le TGF- β , maintient les cellules souches, notamment hématopoïétiques, au repos.

25 Plus particulièrement, le test HPP-Q consiste à déterminer le degré de maturité de cellules souches, notamment hématopoïétiques, et est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 - on effectue la culture d'un premier ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, dans un milieu approprié à leur culture, ledit milieu ne contenant pas de moyens de blocage d'au moins un inhibiteur du développement cellulaire tel le TGF- β , pendant environ 14 à environ 28 jours, de préférence 18 jours,

- on effectue la culture d'un deuxième ensemble de cellules souches, notamment hématopoïétiques, de même nature et de même degré de maturité que celles mentionnées ci-dessus, dans un milieu approprié contenant des moyens de blocage d'au

moins un inhibiteur du développement cellulaire, ces moyens de blocage étant présents, dans le milieu de culture à une concentration efficace,

5 - on compare, 18 jours après la mise en culture de chacun des deux ensembles de cellules souches, le nombre et la nature des colonies, la différence des sommes des colonies à haut potentiel prolifératif (HPP-CFC = progéniteur formant une colonie à haut potentiel prolifératif, HPP-MEG = progéniteur mégacaryocytaire à haut potentiel prolifératif, HPP-GEMM = progéniteur granulocytaire érythrocytaire monocytaire mégacaryocytaire à haut potentiel prolifératif) respectivement dans celle du deuxième ensemble et celle du premier ensemble.

10 L'évaluation de la maturité ou de l'immaturité de cellules souches correspond à l'observation suivante.

15 Après 18 jours, on observe au microscope le nombre et la nature des colonies : on compte le nombre de colonies mixtes constituées de cellules de la lignée rouge et d'un ou de plusieurs types de la lignée blanche. Le nombre de colonies mixtes est plus élevé lorsque la population cellulaire mise en culture est immature, c'est-à-dire constituée de cellules plus jeunes dont certaines sont au repos. D'autre part, plus la cellule qui a donné naissance à la colonie est immature, voire au repos, plus son potentiel de prolifération est grand, donc la colonie provenant de cette cellule une fois activée sera plus importante en taille.

20 **2) Culture des cellules CD34+**

25 Les cellules CD34+ ont été ensemencées à une concentration cellulaire de 10^6 cellules par ml dans des plaques de culture de 24 trous à raison de 1 ml par trou au jour J0. Lesdites cellules ont été ensemencées dans un milieu sans sérum, contenant des cytokines et un inhibiteur du TGF- β (anti TGF- β).

SBA (milieu sans sérum avec albumine) +

| | |
|-----------------------|--------------|
| SF (« Steel Factor ») | 10 ng/ml |
| TPO (Thrombopoïétine) | 10 ng/ml |
| FL (Ligand FLt3) | 50 ng/ml |
| IL6 (Interleukine 6) | 10 ng/ml |
| Anti-TGF β | 4 μ g/ml |

5

Les cellules CD34+ sont incubées à 37°C dans une atmosphère avec 5% de CO2 et une saturation d'humidité à 97%.

10 Tous les 2 jours, le volume de la culture est mesuré, le nombre de cellules CD34+ est compté, et la viabilité desdites cellules est déterminée.

Après avoir compté le nombre de cellules CD34+ contenues dans la culture, on enlève le volume nécessaire pour ne laisser que 10^6 cellules par puits.

15 On réajuste le milieu en volume, en cytokines ou facteurs de croissance et en inhibiteur du TGF- β .

Tous les 8 jours, un tri est effectué pour évaluer les cellules CD34+ et CD38+ et la capacité proliférative des cellules CD34+ est évaluée en test HPP-Q.

Régulièrement, les résultats du test HPP-Q sont confirmés par un test en souris immunodéficientes (SCID-NOD).

20 Le protocole du procédé selon l'invention permet de cultiver les cellules dans un microbioréacteur qui maintient les conditions de milieux constantes pour ce qui est des catabolites et anabolites (cytokines et inhibiteurs exclus).

25 L'ensemencement des cellules CD34+ à une forte concentration cellulaire permet de créer un bioréacteur à forte concentration cellulaire, et ainsi de réduire les volumes de culture.

Principe du bioréacteur ou microbioréacteur

Le microbioréacteur est constitué d'une chambre de culture, de taille adaptée au nombre de cellules et à leur densité cellulaire (1 à 100 ml), séparée d'une chambre de dialyse par une membrane, et éventuellement d'une chambre gazeuse par une autre membrane, pour maintenir constants les constituants du milieu.

30 Des micro détecteurs permettent de contrôler différents paramètres dans la chambre de culture : pH, CO₂, O₂, glucose, lactate, etc.

Des entrées et des sorties permettent de renouveler ou de modifier les milieux de cultures, ou d'ajouter ou de retirer des cellules.

L'ensemble du microbioréacteur peut être automatisé par des pompes et des programmeurs informatisés.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un inhibiteur du développement cellulaire de façon contrôlée pour maintenir l'état indifférencié de cellules souches, notamment de cellules souches humaines, tout en permettant leur division cellulaire.

5 2. Utilisation d'un inhibiteur selon la revendication 1, dans laquelle les cellules souches sont des cellules humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et/ou les cellules souches/progéniteurs somatiques elles/eux mêmes à l'origine du sang et/ou de différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu 10 nerveux.

15 3. Utilisation d'un inhibiteur selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β).

20 4. Utilisation d'un inhibiteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, en association séquentielle avec un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire, pour déclencher un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment pour déclencher une seule division cellulaire, tout en maintenant l'état indifférencié des cellules souches, notamment des cellules souches humaines.

25 5. Procédé de multiplication de cellules souches dans un milieu de culture, notamment de cellules souches humaines, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, à l'état de repos sont sorties de leur état de repos par la neutralisation de l'effet d'un inhibiteur du développement cellulaire, et notamment d'un inhibiteur de la prolifération cellulaire produit par les cellules et/ou présent dans le milieu de culture, de telle sorte qu'il y ait déclenchement d'un nombre de divisions cellulaires allant de 1 à environ 100, notamment de 1 à environ 10, et notamment d'une seule division cellulaire,

- et, une étape dans laquelle les cellules souches, notamment les cellules humaines, obtenues à l'étape précédente sont inhibées dans leur différenciation à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire.

6. Procédé de multiplication selon la revendication 5, caractérisé en ce que à l'issue du procédé de multiplication, les cellules souches ainsi multipliées sont maintenues dans un état indifférencié.

5 7. Procédé de multiplication selon la revendication 5, caractérisé en ce que les cellules souches sont des cellules humaines choisies dans le groupe constitué par les cellules souches embryonnaires à l'origine des cellules souches somatiques, et les cellules somatiques elles mêmes à l'origine du sang et/ou des différents tissus solides tels que la peau, le foie, le pancréas, le cœur, le rein, l'os, ou du tissu nerveux.

10 8. Procédé de multiplication selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que les cellules souches, notamment les cellules humaines, sont présentes à une concentration cellulaire d'environ 1 à environ 10^{10} cellules par ml, et notamment à une concentration allant d'environ 10^3 à environ 10^{10} cellules par ml, et plus particulièrement d'environ 10^4 à environ 10^9 cellules par ml.

15 9. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est synthétisé par les cellules souches, notamment les cellules souches humaines, et/ou est ajouté dans le milieu de culture contenant les cellules souches, notamment les cellules souches humaines.

20 10. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est choisi dans le groupe constitué par les produits de gènes contrôlant le développement cellulaire vis-à-vis de la différenciation cellulaire et/ou de la division cellulaire, les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes, les facteurs contrôlant l'apoptose ou le vieillissement, et les cytokines (tels que les interférons, le TGF β)

25 11. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisé en ce que l'inhibiteur du développement cellulaire est présent à une faible concentration dans le milieu de culture contenant les cellules souches, et notamment à une concentration allant d'environ 10^{-10} mg/ml à 1 mg/ml.

30 12. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 11, caractérisé en ce que la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, est effectuée par

- l'addition dans le milieu de culture, en quantité appropriée, d'un anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire tel qu'un anti-TGF- β , et/ou

5 - le retrait du milieu de culture de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, appartenant notamment au groupe des cytokines.

10 13. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 12, caractérisé en ce que l'anti-inhibiteur de la prolifération cellulaire est présent en une concentration allant d'environ 10^{-18} à environ 10^{-3} g/ml.

15 14. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 13, dans lequel le milieu de culture contient des cellules souches hématopoïétiques et comprend une ou plusieurs cytokines (ajoutées dans le milieu de culture) choisies dans le groupe constitué par les interleukines et les CSF, lesdites cytokines étant présentes à une concentration allant d'environ 10^{-8} μ g/ml à environ 1 mg/ml, et notamment d'environ 10^{-5} μ g/ml à 0,1 μ g/ml.

20 15. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

25 a) l'initiation d'un premier cycle de division de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées dans un milieu de culture, et notamment de cellules souches somatiques hématopoïétiques, par ensemencement de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées à l'état de repos, à une forte concentration cellulaire initiale, notamment à une concentration allant de 10^3 à 10^{10} cellules par ml, en présence d'une ou de plusieurs cytokines, et par la neutralisation de l'effet de l'inhibiteur du développement cellulaire, et notamment de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, présent dans le milieu de culture, de telle sorte que les susdites cellules sortent de leur état de repos par le déclenchement d'une première division cellulaire,

30 b) le retour au repos des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, à l'aide d'un inhibiteur du développement cellulaire, ledit inhibiteur étant synthétisé par lesdites cellules souches, ou étant ajouté dans le milieu de culture,

c) le lavage éventuel des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente, afin d'éliminer les catabolites et l'inhibiteur

du développement cellulaire, et notamment l'inhibiteur de la prolifération cellulaire éventuellement présents dans le milieu de culture,

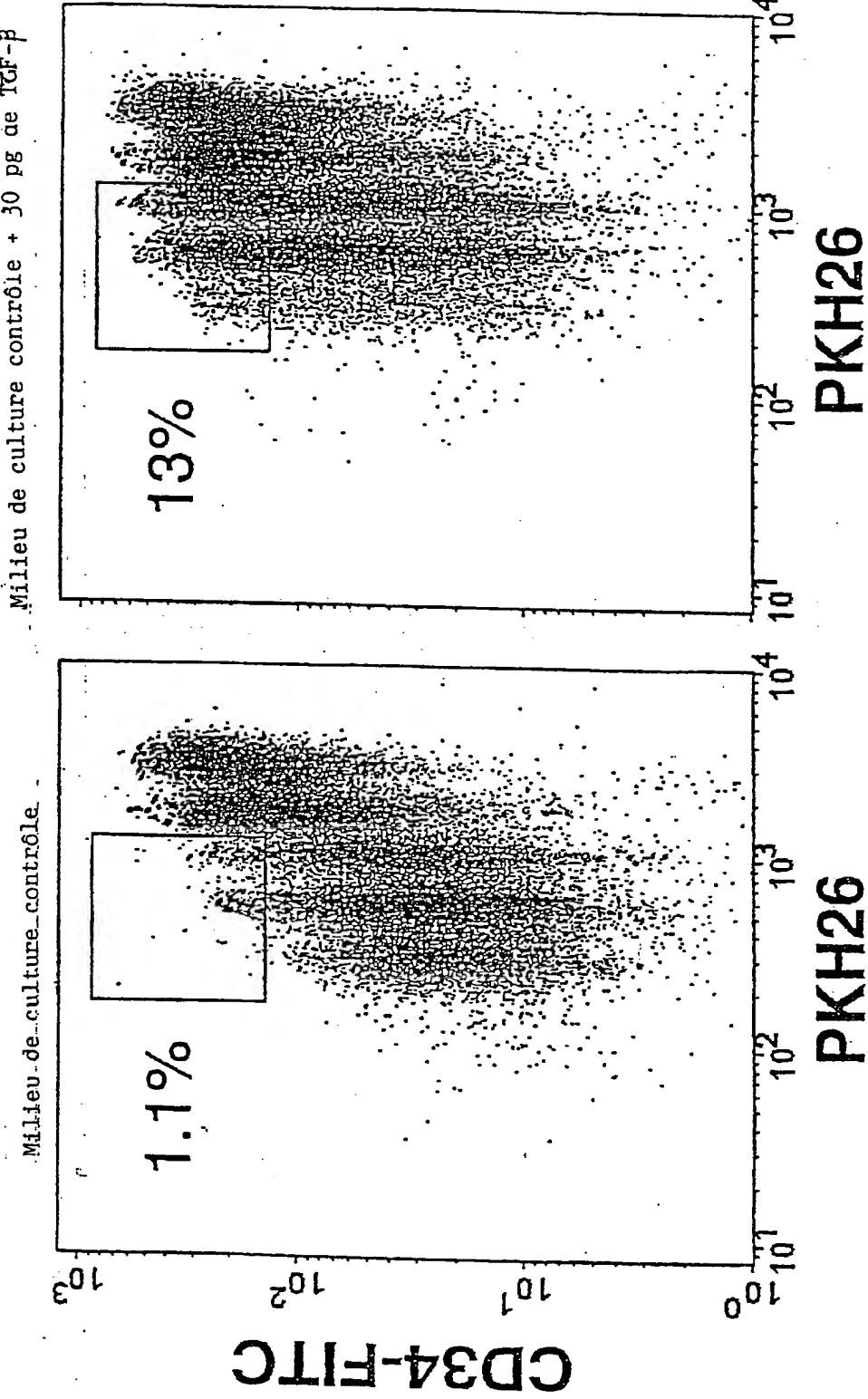
5 d) la dilution éventuelle des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées obtenues à l'étape précédente afin de maintenir une concentration cellulaire optimale allant d'environ 100 à 10^{10} cellules par ml,

10 e) la répétition successive des cycles de division et de repos décrits ci-dessus jusqu'à ce que le facteur d'amplification des cellules soit suffisant pour obtenir le nombre de cellules souches souhaitées, et notamment soit de 2 fois à environ 10^{12} fois le nombre de cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées initiales, ce qui correspond à une durée totale du procédé de multiplication d'environ 1 jour à 3 ans, et notamment de 1 jour à 15 jours,

15 f) l'arrêt de la multiplication des cellules souches embryonnaires ou somatiques non différenciées pour les stocker, les utiliser ou les faire se différencier *in vitro*.

16. Procédé de multiplication selon l'une quelconque des revendications 5 à 15, caractérisé en ce que la durée d'un seul état de repos s'échelonne d'environ 1 heure à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 72 heures, et en ce que la durée d'un seul cycle de division s'échelonne d'environ 6 heures à 3 ans, et est notamment d'environ 6 heures à 24 heures.

20 17. Utilisation des cellules souches humaines non différenciées et amplifiées telles qu'obtenues selon le procédé de l'une quelconque des revendications 5 à 16, pour reconstituer du sang humain et/ou des tissus solides ou organes humains.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte [REDACTED] Application No
PCT/FR 00/01486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/06 C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | HATZFELD J ET AL: "RELEASE OF EARLY HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM QUIESCIENCE BY ANTISENSE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 OR RB OLIGONUCLEOTIDES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 174, 1 October 1991 (1991-10-01), pages 925-929, XP000571050 ISSN: 0022-1007 the whole document --- -/- | 1-16 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 2000

Date of mailing of the international search report

25/09/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No.
PCT/FR 00/01486

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| X | WAEGELL W ET AL: "Growth acceleration and stem cell expansion in Dexter-type cultures by neutralization of TGF-beta." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 22, 1994, pages 1051-7, XP000572237 page 1054, left-hand column, line 46 -page 1055, left-hand column, line 10 page 1055, right-hand column, line 3 - line 13 --- | 1-16 |
| X | MUMMERY C L ET AL: "Expression of transforming growth factor beta 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (1990 JAN) 137 (1) 161-70., XP000891381 page 162, left-hand column, line 14 - line 25 page 162, right-hand column, line 25 - line 38 page 164, right-hand column, line 1 - line 24 page 165, right-hand column, line 26 - line 52 page 168, right-hand column, line 25 - line 36 --- | 1-3 |
| X | EP 0 834 556 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 25 September 1996 (1996-09-25) claims 1-11 --- | 1-3 |
| A | WIANNY F ET AL: "Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro." BIOLOGY OF REPRODUCTION, (1997 OCT) 57 (4) 756-64., XP000700182 abstract page 763, left-hand column, line 50 - line 60 --- | 1-17 |
| T | DUCOS KARIN ET AL: "p21cip1 mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 184, no. 1, July 2000 (2000-07), pages 80-85, XP000939301 ISSN: 0021-9541 ----- | 1-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte [REDACTED] Application No

PCT/FR 00/01486

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date | | | |
|--|------------------|-------------------------|------------|------------------|------------|--------------|------------|
| EP 0834556 A | 08-04-1998 | AU 4225797 A | 17-04-1998 | EP 0928328 A | 14-07-1999 | WO 9813475 A | 02-04-1998 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Denomination internationale No
PCT/FR 00/01486

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N5/06 C12N5/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | HATZFELD J ET AL: "RELEASE OF EARLY HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM QUIESCEENCE BY ANTISENSE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 OR RB OLIGONUCLEOTIDES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 174, 1 octobre 1991 (1991-10-01), pages 925-929, XP000571050 ISSN: 0022-1007 le document en entier --- -/- | 1-16 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11 septembre 2000

25/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den Internationale No
PCT/FR 00/01486

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | WAESELL W ET AL: "Growth acceleration and stem cell expansion in Dexter-type cultures by neutralization of TGF-beta." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 22, 1994, pages 1051-7, XP000572237 page 1054, colonne de gauche, ligne 46 -page 1055, colonne de gauche, ligne 10 page 1055, colonne de droite, ligne 3 - ligne 13 --- | 1-16 |
| X | MUMMERY C L ET AL: "Expression of transforming growth factor beta 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (1990 JAN) 137 (1) 161-70., XP000891381 page 162, colonne de gauche, ligne 14 - ligne 25 page 162, colonne de droite, ligne 25 - ligne 38 page 164, colonne de droite, ligne 1 - ligne 24 page 165, colonne de droite, ligne 26 - ligne 52 page 168, colonne de droite, ligne 25 - ligne 36 --- | 1-3 |
| X | EP 0 834 556 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 25 septembre 1996 (1996-09-25) revendications 1-11 --- | 1-3 |
| A | WIANNY F ET AL: "Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro." BIOLOGY OF REPRODUCTION, (1997 OCT) 57 (4) 756-64., XP000700182 abrégé page 763, colonne de gauche, ligne 50 - ligne 60 --- | 1-17 |
| T | DUCOS KARIN ET AL: "p21cip1 mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 184, no. 1, juillet 2000 (2000-07), pages 80-85, XP000939301 ISSN: 0021-9541 ----- | 1-16 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

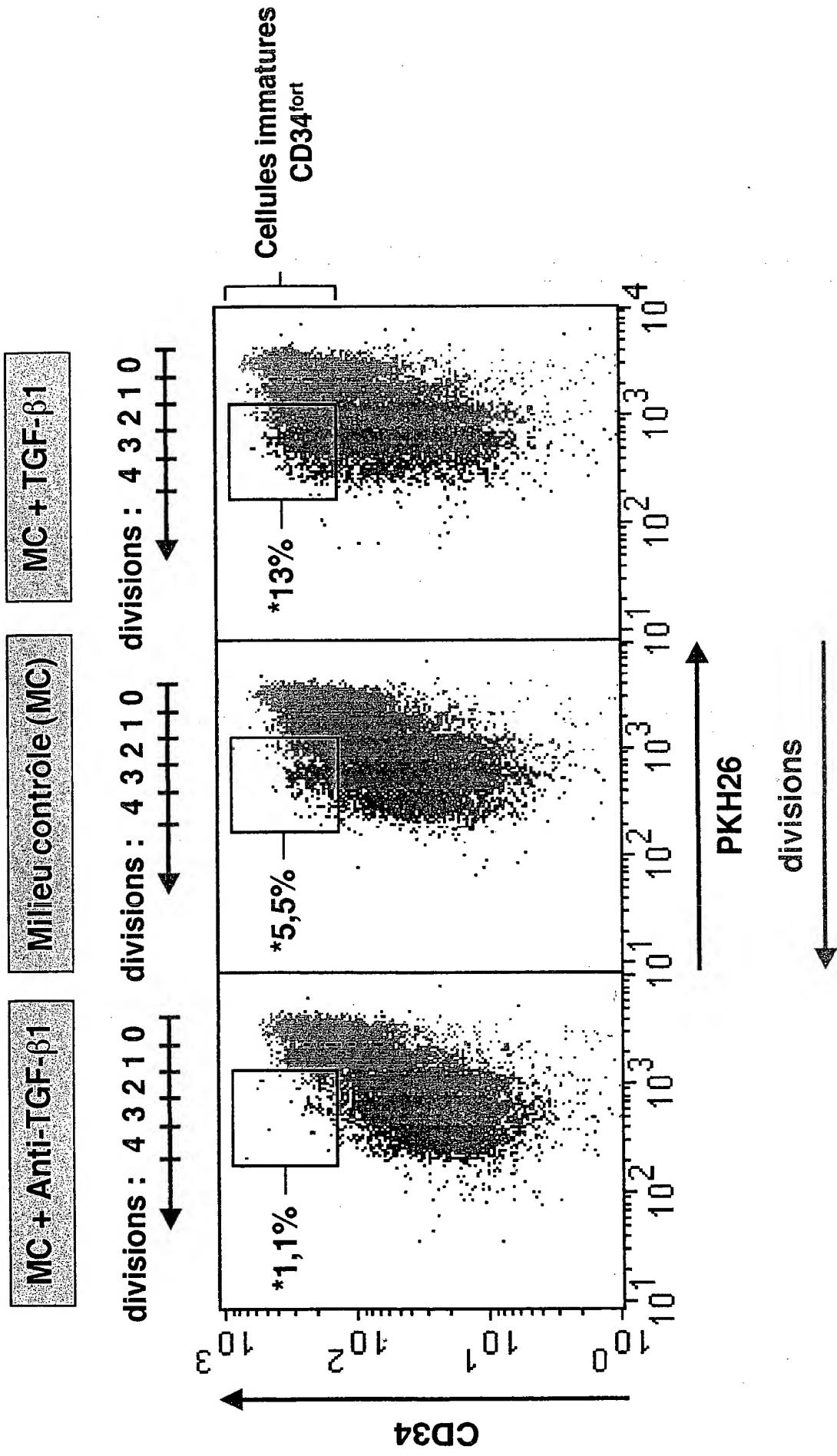
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den Internationale No

PCT/FR 00/01486

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|------------------------|---|-----------|------------------------|
| EP 0834556 A | 08-04-1998 | AU | 4225797 A | 17-04-1998 |
| | | EP | 0928328 A | 14-07-1999 |
| | | WO | 9813475 A | 02-04-1998 |

Maintien de l'état indifférencié des cellules hématopoïétiques primitives en réponse au TGF- β 1



*Cellules ayant conservé des caractéristiques indifférenciées après 2 à 4 divisions successives (3 jours de culture)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

91980484

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference WOB 99 AH CNR SOMA | FOR FURTHER ACTION | See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |
| International application No. PCT/FR00/01486 | International filing date (day/month/year) 30 May 2000 (30.05.00) | Priority date (day/month/year) 03 June 1999 (03.06.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/06 | | |
| Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE | | |

| |
|--|
| 1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. |
| 2. This REPORT consists of a total of <u>13</u> sheets, including this cover sheet. |
| <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). |
| These annexes consist of a total of _____ sheets. |
| 3. This report contains indications relating to the following items: |
| I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report |
| II <input type="checkbox"/> Priority |
| III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention |
| V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited |
| VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application |
| VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application |

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 21 November 2000 (21.11.00) | Date of completion of this report 13 August 2001 (13.08.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages 1-16, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages 1-17, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages 1/1, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 1-4,17

because:

the said international application, or the said claims Nos. 1-4,17 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

SEE SEPARATE SHEET

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The present notification refers to the following documents, which are cited in the search report:

D1: HATZFELD J. et al., JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 174 (1991), pages 925-929

D2: WAESELL W. et al., EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 22 (1994), pages 1051-1057

D3: MUMMERY C. L. et al., DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 137(1) (1990), pages 161-70.

The present notification also refers to document D4, which is cited in the present application.

D4: Piacibello W. et al., BLOOD, vol. 89(8) (1997), pages 2644-2653.

The present Authority considers that the wording of **Claims 1-4 and 17** (failure to mention 'in vitro') is such that the subject matter thereof encompasses a compound for medical use. Therefore, the provisions of PCT Rule 67.1(iv) cover the subject matter of said claims. For this reason, no opinion will be given on the question of whether the subject matter of these claims is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)) (see also Box V, industrial applicability).

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

SEE SEPARATE SHEET

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

The present application lacks unity of invention since the concept linking the different claims, namely 'undifferentiated and amplified stem cells', is not novel (see the introduction of the present application, page 1, lines 7-29; see document D1, Figure 2 and lines 17-19, page 927 which shows a method for deriving a colony of undifferentiated cells from a single parent stem cell; see document D2, page 1055, lines 24-35 and page 1056, lines 13-17; see document D4, the abstract, lines 15-18 and the final paragraph of the introduction). Therefore, the application is divided into several inventions which are not linked by a single general inventive concept (indeed, each independent claim constitutes a group of inventions). Despite this objection, the applicant is not requested to pay additional fees. However, the International Preliminary Examining Authority (IPEA) will follow up this objection if the file is taken into the regional phase with the EPO.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 5-17 | YES |
| | Claims | 1-4 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-17 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 5-16 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Novelty - PCT Article 33(2)

1. The subject matter of the present application is (1) the controlled use of a cell growth inhibitor for maintaining the undifferentiated state of stem cells, particularly human stem cells, while enabling the cell division thereof, (2) a culturing method which makes it possible to multiply said stem cells while maintaining the undifferentiated state thereof, and (3) the use of the resulting cells for reconstructing tissue and/or organs to be transplanted.
2. Document D1 shows that the controlled use of a cell growth inhibitor (TGF- β 1) (blocking the action thereof using antisense oligonucleotides or antibodies) enables human stem cells to be released from their quiescent state, in other words, it enables the proliferation thereof. Moreover, in view of the results shown, it clearly appears that this multiplication is not accompanied by any differentiation (see Figure 2 and lines 17-19, page 927 which shows a colony derived from a single parent stem cell, namely, by definition, obtaining a

group of cells identical to the parent cell and, therefore, undifferentiated). Therefore, document D1 anticipates the subject matter of **Claims 1-4**.

Document D2 describes the controlled use of a cell growth inhibitor (TGF- β 1, - β 2 and - β 3) (by blocking the activity thereof using an antibody) for maintaining the undifferentiated state of murine hematopoietic stem cells while enabling the cell division thereof (see the abstract; see Results, 1st and 2nd paragraphs and Figures 1 and 2; see Discussion, page 1055 right-hand column, 2nd and 3rd paragraphs and page 1056, lines 13-17). Therefore, document D2 also anticipates the subject matter of **Claims 1, 3 and 4**.

It should be noted that these objections concerning novelty result from the fact that the subject matter of Claims 1-4 is badly defined in a general and imprecise manner, using functional features or a result to be achieved instead of the essential technical features of the invention (see the objections in Box VIII, paragraphs 1 and 2). More particularly, the expressions 'controlled' and 'in sequential association' are vague and do not make it clear that the invention consists in neutralising TGF- β using an antibody or by washing and then adding said TGF- β at precise concentrations making it possible to inhibit differentiation without blocking cell division. In other words, in the current form, it is impossible to delimit the subject matter of Claims 1-4 in an unambiguous manner in relation to the prior art with regard to novelty.

3. The subject matter of **Claims 5-17** is not described in the prior art made available to the IPEA. Therefore, the subject matter of said claims meets the requirements of PCT Article 33(2).

Inventive step - PCT Article 33(3)

1. Claim 5 relates to a method for stem cell multiplication which includes a first step wherein the stem cells are released from their quiescent state by neutralising the effect of a cell growth inhibitor so as to trigger a number of cell divisions ranging from 1 to 100, and a second step wherein the differentiation of the cells resulting from the previous step is inhibited using a cell growth inhibitor. The subject matter of this claim does not involve an inventive step under the terms of PCT Article 33(3), for the following reasons:

Document D1, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 5, describes a method for stem cell multiplication, in particular human stem cells, which includes a single step wherein said cells are released from their quiescent state by neutralising the TGF- β using antisense oligonucleotides or an anti-TGF- β 1 antibody.

The subject matter of Claim 5 differs from that of D1 in that a second step is carried out wherein the cells resulting from the first step are subjected to the action of a cell growth inhibitor.

The technical effect associated with this difference is that the undifferentiated multiplied stem cells resulting from the previous step are maintained in

their undifferentiated state.

Therefore, the problem that Claim 5 aims to solve is that of providing means for stopping stem cells returned to a dividing state from entering into a state of differentiation.

The solution to this problem is to add a cell growth inhibitor after the first step.

The technical effect on the basis of which the selection of compounds is justified should be one that can reasonably be expected to be achieved using all of the selected compounds. However, the present application has not shown that any cell growth inhibitor is capable of solving the stated problem. Furthermore, the description does not provide any explanation or justification to suggest that this is the case. Therefore, in principle, the subject matter of **Claim 5** cannot be considered to be inventive (PCT Article 33(3)).

Moreover, the wording of Claim 5 is so general, imprecise and lacking in essential technical features (see the objections concerning PCT Article 6, Box VIII, paragraphs 1-6) that the subject matter thereof encompasses embodiments of the method that are not disclosed, or suggested, in the description and **are unable to solve the stated problem**.

Therefore, also for this reason, the subject matter of **Claim 5** cannot be considered to be inventive under the terms of PCT Article 33(3)).

2. The features of **Claims 6-16** either already appear in the prior art (Claim 6, see the D2, Discussion, page

1055, right-hand column, 3rd paragraph and page 1056, lines 13-17; Claims 7, 8, 14, see D1, Materials and Methods 'Cell preparation and cell culture'; Claims 9-12, see D1 and D2; Claim 13, see D1, Materials and Methods 'Growth factors and antibodies'), or form part of standard technical practice (Claims 15 and 16). Therefore, if combined with Claim 5, they are not suitable for rendering said claim novel (PCT Article 33(3)).

3. Claim 17 is merely a novel use of undifferentiated and amplified stem cells already described in document D4. However, this use does not involve any advantages other than those resulting from the properties of said cells which are disclosed in D4 (see the abstract, lines 17 and 18, the final paragraph of the introduction and final paragraph of the Discussion). Therefore, the subject matter of **Claim 17** does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

Industrial applicability - PCT Article 33(1) and (4)

There are no uniform criteria in the PCT Contracting States for determining whether **Claims 1-4 and 17** are industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the subject matter of use claims relating to the medical use of a compound to be industrially applicable. However, claims relating to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims relating to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirement of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in documents D1 and D2 has not been indicated in the description, nor have these documents been cited.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The following wording:

- 'in a controlled manner for maintaining the undifferentiated state of stem cells, while enabling the cell division thereof' (**Claim 1**)
- 'in sequential association with ... to trigger a number of divisions ranging from 1 to around 100 ... while maintaining the undifferentiated state of the stem cells' (**Claim 4**)
- 'by neutralising the effect of a cell growth inhibitor ... so as to ... (**Claims 5 and 15**)

defines the subject matter of said claims in terms of the result to be achieved and not the technical features required to achieve said result. This kind of definition introduces a lack of clarity concerning the subject matter for which protection is sought. Therefore, the claims should be re-drafted by adding the technical features required for achieving said result (PCT Article 6).

2. The wording 'cell growth inhibitor', 'cell proliferation anti-inhibitor', 'gene products controlling cell growth with regard to cell differentiation and/or division', 'cyclin-dependant kinase inhibitors' and 'factors controlling apoptosis or ageing' in Claims 1, 3-5, 9-13 and 15 are vague and imprecise and lead to doubt as to the scope of the protection sought since they define the compound in terms of its function and not the structural features thereof. This kind of definition does not refer to a specific compound or group of

VIII. Certain observations on the international application

compounds but rather encompasses an infinite number of compounds which could have very different chemical compositions. Therefore, the subject matter of **Claims 1, 3-5, 9-13 and 15** does not meet the requirements of PCT Article 6 (lack of clarity, lack of support).

3. Only haematopoietic human somatic cells are shown in the application (see Example) and no information is given to justify a generalisation made to 'stem cells', 'embryonic stem cells' or even 'stem cells leading to various solid tissue'. Therefore, the subject matter of **Claims 1-17** does not meet the requirements of PCT Article 6 (the subject matter for which protection is sought is not supported by the description).
4. Only the cell growth inhibitor 'TGF- β ' is shown in the description. Therefore, the generalisation made to all cell growth inhibitors in **Claims 1-17** is not supported (PCT Article 6). Furthermore, all TGF- β s, without any isoform distinction, are suggested as cell differentiation inhibitors. Although it is known that all isoforms are responsible for inhibiting stem cell proliferation, it is not shown in the application that they are all capable of inhibiting cell differentiation. Therefore, the generalisation made to all TGF- β s (**Claims 3 and 10**) is also not permitted (lack of support, PCT Article 6).
5. The initial cellular concentration, the method for neutralising the cell growth inhibitor, the

VIII. Certain observations on the international application

inhibition method used in step (b), the concentration of the cell growth inhibitor and anti-inhibitor and the composition of the culture medium are not mentioned in Claim 5. However, according to the description, these technical features are **essential** for the implementation of the method of Claim 5 ('neutralisation method', see page 7, lines 1-28, page 8, lines 7-9; 'inhibition method used in step (b)', see page 6, lines 3-9; 'concentration of the cell growth inhibitor', see page 6, lines 10-33; 'concentration of the cell growth anti-inhibitor', see page 7, lines 32 to page 8, line 13, 'composition of the culture medium', see page 9, lines 16-29). Therefore, **Claim 5** fails to comply with the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which an independent claim must contain all of the technical features essential for the definition of the invention.

6. The terms 'around, 'low concentration', 'in a suitable amount', 'high initial cell concentration' used in **Claims 4, 5, 8 and 11-16** are vague and unclear and lead to doubt as to the meaning of the technical feature to which they refer. This is more the case since the expression 'in particular' used in these claims has no limiting effect on the scope thereof. In other words, the following features are considered to be entirely optional (PCT Guidelines, Chapter III-4.6). Therefore, the subject matter of said claims is not clearly defined (PCT Article 6).
7. The key to **Figure 1** and the Example showing the

VIII. Certain observations on the international application

multiplication method are not clear. The measurements taken are not explained (instruments used for detecting CD34+ cells labelled with PKH26 dye?) and the comments are unclear:

- different populations are thereby obtained which move towards the right' (page 12, lines 17 and 18);
- cells with an average pKH26 intensity are sorted in a window representing around 10% of the complete width' (page 13, lines 15 and 16).

8. There is a contradiction between the description and Claims 5-16. The method for multiplying haematopoietic stem cells shown in the example of the description (pages 12-15) comprises a single step of neutralising TGF- β . Whereas the method claimed in Claims 5-16 has a second step (step (b)). This contradiction between the claims and the description leads to doubt as to the subject matter for which protection is sought. Therefore, an objection is raised under the terms of PCT Article 6.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|--|---|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB 99 AH CNR SOMA | POUR SUITE A DONNER | voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après |
| Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01486 | Date du dépôt international(jour/mois/année) 30/05/2000 | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 03/06/1999 |

Déposant

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des **dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01486

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N5/06 C12N5/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | HATZFELD J ET AL: "RELEASE OF EARLY HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM QUIESCEENCE BY ANTISENSE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 OR RB OLIGONUCLEOTIDES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 174, 1 octobre 1991 (1991-10-01), pages 925-929, XP000571050 ISSN: 0022-1007 le document en entier --- -/- | 1-16 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01486

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | WAESELL W ET AL: "Growth acceleration and stem cell expansion in Dexter-type cultures by neutralization of TGF-beta." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 22, 1994, pages 1051-7, XP000572237 page 1054, colonne de gauche, ligne 46 -page 1055, colonne de gauche, ligne 10 page 1055, colonne de droite, ligne 3 - ligne 13 --- | 1-16 |
| X | MUMMERY C L ET AL: "Expression of transforming growth factor beta 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (1990 JAN) 137 (1) 161-70., XP000891381 page 162, colonne de gauche, ligne 14 - ligne 25 page 162, colonne de droite, ligne 25 - ligne 38 page 164, colonne de droite, ligne 1 - ligne 24 page 165, colonne de droite, ligne 26 - ligne 52 page 168, colonne de droite, ligne 25 - ligne 36 --- | 1-3 |
| X | EP 0 834 556 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 25 septembre 1996 (1996-09-25) revendications 1-11 --- | 1-3 |
| A | WIANNY F ET AL: "Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro." BIOLOGY OF REPRODUCTION, (1997 OCT) 57 (4) 756-64., XP000700182 abrégé page 763, colonne de gauche, ligne 50 - ligne 60 --- | 1-17 |
| T | DUCOS KARIN ET AL: "p21cip1 mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 184, no. 1, juillet 2000 (2000-07), pages 80-85, XP000939301 ISSN: 0021-9541 ----- | 1-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01486

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| EP 0834556 A | 08-04-1998 | AU 4225797 A EP 0928328 A WO 9813475 A | 17-04-1998 14-07-1999 02-04-1998 |

TRAITE DE L'OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

| | |
|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 31 janvier 2001 (31.01.01) | Destinataire: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE en sa qualité d'office élu |
| Demande internationale no PCT/FR00/01486 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB 99 AH CNR SOMA |
| Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 mai 2000 (30.05.00) | Date de priorité (jour/mois/année) 03 juin 1999 (03.06.99) |
| Déposant HATZFELD, Jacques, Alexandre etc | |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

21 novembre 2000 (21.11.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

| | |
|--|--|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé Antonia Muller no de téléphone: (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/01486

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 €12N5/06 C12N5/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|---|-------------------------------|
| X | HATZFELD J ET AL: "RELEASE OF EARLY HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITORS FROM QUIESCIENCE BY ANTISENSE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA1 OR RB OLIGONUCLEOTIDES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 174, 1 octobre 1991 (1991-10-01), pages 925-929, XP000571050, ISSN: 0022-1007 le document en entier --- -/- | 1-16 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

• Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

| | |
|---|--|
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
| 11 septembre 2000 | 25/09/2000 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Fonctionnaire autorisé Le Flao, K |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/01486

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | WAEGELL W ET AL: "Growth acceleration and stem cell expansion in Dexter-type cultures by neutralization of TGF-beta." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 22, 1994, pages 1051-7, XP000572237 page 1054, colonne de gauche, ligne 46 -page 1055, colonne de gauche, ligne 10 page 1055, colonne de droite, ligne 3 -ligne 13 --- | 1-16 |
| X | MUMMERY C L ET AL: "Expression of transforming growth factor beta 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (1990 JAN) 137 (1) 161-70., XP000891381 page 162, colonne de gauche, ligne 14 - ligne 25 page 162, colonne de droite, ligne 25 - ligne 38 page 164, colonne de droite, ligne 1 - ligne 24 page 165, colonne de droite, ligne 26 - ligne 52 page 168, colonne de droite, ligne 25 - ligne 36 --- | 1-3 |
| X | EP 0 834 556 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 25 septembre 1996 (1996-09-25) revendications 1-11 --- | 1-3 |
| A | WIANNY F ET AL: "Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro." BIOLOGY OF REPRODUCTION, (1997 OCT) 57 (4) 756-64., XP000700182 abrégé page 763, colonne de gauche, ligne 50 - ligne 60 --- | 1-17 |
| T | DUCOS KARIN ET AL: "p21cip1 mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells." JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 184, no. 1, juillet 2000 (2000-07), pages 80-85, XP000939301 ISSN: 0021-9541 ----- | 1-16 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01486

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | | Date de publication |
|---|------------------------|---|----|-----------|------------------------|
| EP 0834556 | A | 08-04-1998 | AU | 4225797 A | 17-04-1998 |
| | | | EP | 0928328 A | 14-07-1999 |
| | | | WO | 9813475 A | 02-04-1998 |

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL
de la,
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 572729
FR 9907011

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendications concernées de la demande examinée | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IntCL?) |
|--|--|---|--|
| X | WIANNY F ET AL: "Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro." BIOLOGY OF REPRODUCTION, (1997 OCT) 57 (4) 756-64. , XP000891390 * abrégé * * page 763, colonne de gauche, ligne 50 - ligne 60 * | 1-8,14 | |
| Y | | 9-13, 15-17 | |
| X | MUMMERY C L ET AL: "Expression of transforming growth factor beta 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells." DEVELOPMENTAL BIOLOGY, (1990 JAN) 137 (1) 161-70. , XP000891381 * page 162, colonne de gauche, ligne 14 - ligne 25 * * page 162, colonne de droite, ligne 25 - ligne 38 * * page 164, colonne de droite, ligne 1 - ligne 24 * * page 165, colonne de droite, ligne 26 - ligne 52 * * page 168, colonne de droite, ligne 25 - ligne 36 * | 1-3 | |
| Y | | 9-13 | C12N |
| X | EP 0 834 556 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 25 septembre 1996 (1996-09-25) * revendications 1-11 * | 1-3 | |
| Y | | 15-17 | |
| | | -/- | |
| 1 | Date d'achèvement de la recherche 22 mars 2000 | Examinateur Le Flao, K | |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | | | |

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la,
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

**N° d'enregistrement
national**

FA 572729
FR 9907011

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|--|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | <p>WAEGELL W ET AL: "Growth acceleration and stem cell expansion in Dexter-type cultures by neutralization of TGF-beta." <i>EXPERIMENTAL HEMATOLOGY</i>, vol. 22, 1994, pages 1051-7, XP000572237</p> <p>* page 1054, colonne de gauche, ligne 46 - * page 1055, colonne de gauche, ligne 10 * * page 1055, colonne de droite, ligne 3 - ligne 13 *</p> | 1-17 |
| DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7) | | |
| Date d'achèvement de la recherche | 22 mars 2000 | Examinateur |
| | | Le Flao, K |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul | T : théorie ou principe à la base de l'invention | |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie | E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. | |
| A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général | D : cité dans la demande | |
| O : divulgation non-écrite | L : cité pour d'autres raisons | |
| P : document intercalaire | & : membre de la même famille, document correspondant | |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 572729
FR 9907011

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier Informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,
ni de l'Administration française

22-03-2000

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|------------------------|---|-----------|------------------------|
| EP 0834556 | A 08-04-1998 | AU | 4225797 A | 17-04-1998 |
| | | EP | 0928328 A | 14-07-1999 |
| | | WO | 9813475 A | 02-04-1998 |